

ВИДІЛЕННЯ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА ІНСУЛІНОВОГО РЕЦЕПТОРА ПЛАЗМАТИЧНИХ МЕМБРАН КЛІТИН ПЕЧІНКИ ЩУРІВ НА МОДЕЛІ ДІАБЕТУ 2-го ТИПУ

Т. І. Галенова
М. Ю. Кузнєцова
О. М. Савчук
Л. І. Остапченко

Київський національний університет
імені Тараса Шевченка, Україна

E-mail: galenovatanya@rambler.ru

Отримано 29.11.2013

Виділено інсуліновий рецептор із мембран клітин печінки контрольних і діабетичних щурів. Чистоту та якість отриманого протеїнового препарату було підтверджено результатами методів електрофорезу і вестерн-блот-аналізу. Досліджено тирозинпротеїнкіназну активність виділеного препарату за присутності у середовищі інкубації інсуліну в діапазоні концентрацій від 10^{-11} М до 10^{-5} М. Встановлено, що за умов експериментального цукрового діабету 2-го типу тирозинкіназна активність очищеного рецептора, за відсутності інсуліну, була в межах відповідних контрольних значень. Показано, що як у контролі, так і в умовах цукрового діабету інсуліновий рецептор виявляв максимальну активність за концентрації гормону 10^{-8} М. Одержані результати свідчать про те, що в умовах експерименту не спостерігали порушень у функціонуванні інсулінового рецептора, які могли би бути причиною розвитку інсулінорезистентного стану.

Ключові слова: інсуліновий рецептор, інсулінорезистентність, цукровий діабет 2-го типу.

Інсуліновий рецептор (ІР) — мембранозв'язана тирозинова протеїнкіназа (ЖФ 2.7.1.112), яка відповідає за реалізацію біологічних ефектів інсуліну [1]. За своєю природою це складний глікопротеїн, що має гетеротетрамерну структуру: дві зовнішньоклітинні α -субодиниці, які містять кілька сайтів зв'язування з молекулою інсуліну, дві трансмембранні β -субодиниці, яким притаманна тирозинпротеїнкіназна (ТПК-азна) активність, що не виявляється за відсутності гормону [2]. Приєднання молекули інсуліну до відповідних сайтів зв'язування ІР спричинює активацію його тирозинкіназного домену, який передає сигнал до внутрішньоклітинних месенджерів суміжних сигнальних шляхів. До регуляторних процесів залучаються: фосфатидилінозитол-3-кіназний каскад, через який відбувається регуляція вуглеводного, ліпідного та протеїнового обміну, транслокація і вбудовування в плазматичну мембрану міоцитів та адипоцитів переносника глюкози GLUT-4 [3], Ras/MAP-кіназний шлях, за допомогою якого забезпечується вияв мітогенних, проліфера-

тивних та протизапальних ефектів інсуліну [4], SAP/Cbl/TC10-шлях, що є альтернативним механізмом контролю переміщення GLUT-4 [5].

З огляду на вищезазначене зрозуміло, що ІР є першою та ключовою критичною ланкою на шляху трансдукції інсулінового сигналу. На сьогодні нагромаджено великий обсяг фактичного матеріалу, який свідчить про те, що зниження ТПК-азної активності ІР може стати причиною розвитку клітинної інсулінорезистентності (ІНР), яка, у свою чергу, є передумовою для формування таких патологічних станів, як ожиріння, цукровий діабет (ЦД) 2-го типу, синдром полікістозних яєчників, артеріальна гіпертензія тощо [6, 7]. У літературі як можливі механізми, що призводять до зниження ТПК-азної активності ІР, розглядають: зменшення кількості інсулінових рецепторів на поверхні клітин [8], різноманітні порушення їх інтерналізації [9], мутації гена ІР [10] тощо. Однак одностайної думки щодо механізмів порушення функціонування ІР на сьогодні немає, а низку аспектів цієї проблеми ще не з'ясовано.

Тому дослідження молекулярних та біохімічних механізмів функціонування ІР залишається актуальним, а нові експериментальні дані можуть мати вагоме значення у розкритті патогенетичних механізмів розвитку захворювань, в основі яких лежить явище ІНР.

Метою роботи було виділити препарат ІР із плазматичних мембран клітин печінки щурів з експериментальним ЦД 2-го типу та дослідити його чутливість до дії інсуліну.

Матеріали і методи

У роботі дотримувалися міжнародних рекомендацій щодо здійснення медико-біологічних досліджень з використанням тварин відповідно до Європейської конвенції (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes). Досліди проводили на нелінійних білих щурах. Експериментальний ЦД 2-го типу в піддослідних тварин викликали одноразовим внутрішньочеревним введенням новонародженим щурят розчину стрептозотоцину (СТЦ) (Sigma, США) з розрахунку 80 мг/кг маси тіла [11]. Дослідних тварин утримували на стандартному раціоні віварію. В експериментах використовували дорослих щурів віком від 5 до 6 місяців. До контрольної групи входили інтактні щури такої самої статі та віку.

ІР виділяли з плазматичних мембран клітин печінки щурів методом афінної хроматографії на колонці з інсулін-сефарозою [12, 13]. Для одержання афінного сорбенту застосовували метод іммобілізації інсуліну (Sigma, США) на матриці бромціан(BrCN)-активованої сефарози (Amersham, США) [13].

Процедура підготовки біологічного матеріалу для проведення афінної хроматографії включала такі етапи: 1) одержання грубої мембранної фракції клітин печінки щурів [12]; 2) солюбілізація мембранної фракції у присутності 1%-го Тритон Х-100 [13]; 3) хроматографія на колонці із Сефадекс G-25 (Sigma, США) з метою позбутися залишків детергенту.

Очищений солюбілізований матеріал наносили на колонку з інсулін-сефарозою. Неспецифічно зв'язані протеїни відмивали 50 мМ трис-НСІ-буфером, рН 7,4, з 1 М NaCl. Елюцію виконували 50 мМ ацетатним буфером, рН 5,0, з 1 М NaCl та 0,1%-м Тритон Х-100. Фракції елюату, які містили протеїн з ТПК-азною активністю об'єднували й використовували для дослідження чутливості рецептора до дії інсуліну.

Концентрацію протеїну визначали за методом [14]. ТПК-азну активність встановлювали за методом імуноензимного аналізу, який проводили у мікропланшетах із сорбційною здатністю за стандартною методикою для розчинних протеїнів [15]. У лунки мікропланшета вносили по 110 мкл розчину тирозинпротеїнкіназного субстрату — poly-Glu-Tyr, 4:1, (Sigma, США) з концентрацією 200 мкг/мл. Після 12 год інкубації за 37 °С лунки промивали 10 мМ Na-фосфатним буфером (рН 7,4), що містив 0,05% -й Твін-20, який надалі використовували як буфер для відмивання. Планшет висушували протягом 2 год при 37 °С. У всі лунки вносили по 90 мкл інкубаційного середовища, яке містило 50 мМ HEPES (рН 7,4), 20 мМ MgCl₂, 0,1 мМ MnCl₂, 0,2 мМ Na₃VO₄ та 35 нМ АТФ. Реакцію фосфорильовання ініціювали, додаючи до середовища інкубації 20 мкл досліджуваної проби, і витримували 30 хв за 30 °С. У холосту пробу вносили 20 мкл dH₂O. Усі наступні етапи виконували згідно з класичним протоколом для імуноензимного аналізу. Детекцію залишків тирозину, які було фосфорильовано в ході реакції, здійснювали за допомогою мишачих моноклональних фосфотирозинових антитіл, кон'югованих з пероксидазою хрому (Sigma, США) у розведенні 1:10 000. Як субстрат для пероксидази у роботі використовували комерційний таблетований препарат комплексу H₂O₂-OPD (Sigma, США). Розвиток кольорової реакції тривав 7 хв у темряві за кімнатної температури. Зупиняли реакцію додаванням стоп-розчину — 1,5 М H₂SO₄. Оптичну густину проб вимірювали за довжини хвилі 492 нм. ТПК-азну активність вираховували, застосовуючи стандарт — очищений рецептор епідермального фактора росту, що мав відому ТПК-азну активність (Sigma, США), і виражали у пмоль Ф_n на 1 мг протеїну за 1 хв. Показники інсулінстимульованої ТПК-азної активності встановлювали за присутності 10⁻⁷ М інсуліну в середовищі інкубації.

Для перевірки чистоти ІР проводили диск-електрофорез у 6%-му поліакриламідному гелі (ПААГ) за присутності додецилсульфату натрію за методом [16]. Для відновлення дисульфідних зв'язків застосовували 5%-й β-меркаптоетанол. Гелі фарбували 2,5%-м розчином Кумасі G-250 у 25%-му ізопропанолі та 10%-й оцтовій кислоті. У роботі використовували протеїни-маркери з молекулярною масою 250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20 кДа (Bio-Rad, США). Для визначення молекулярних мас протеїнів елюату, електрофореграми було опрацьовано за допомогою програми TotalLab 2.01.

З метою контролю якості протеїнового матеріалу було проведено вестерн-блот-аналіз згідно зі стандартним протоколом [17]. Протеїни елюату після диск-електрофорезу в 6% -му ПААГ, здійсненого за невідновлених умов, переносили на нітроцелюлозну мембрану. Після блокування неспецифічних ділянок зв'язування нітроцелюлозну пластинку інкубували спочатку з мишачими моноклональними антитілами проти β -субодиниці ІР щурів (Millipore, США), а надалі зі вторинними антимишачими антитілами, кон'югованими з пероксидазою (Bio-Rad, США). Для детекції поліпептидних зон використовували високочутливий субстрат 3,3'-діамінобензидин (Sigma, США).

Експериментальні дані обробляли статистично з використанням t-критерію Стьюдента. Статистичний аналіз даних здійснювали в режимі програмного забезпечення Excel-2003.

Результати та обговорення

ТПК-азна активність ІР є ключовим фактором реалізації біологічних ефектів інсуліну. За нормальних умов ТПК-азна активність у клітинах печінки, м'язів та адипоцитів зростає пропорційно до рівня глюкози у діапазоні фізіологічної концентрації інсуліну в плазмі, тоді як за умов розвитку ІНР деякі дослідники фіксували зниження ТПК-азної активності [18, 19]. Результати наших попередніх досліджень *in vitro*, виконаних на біологічному матеріалі від щурів з моделлю СТЦ-індукованого ЦД 2-го типу, показали зниження показників як базальної, так й інсулінстимульованої мембранозв'язаної ТПК-азної активності [20]. Було підтверджено, що за умов цієї експериментальної моделі встановлені зміни можуть бути наслідком активації ензимів родини тирозинових протеїнофосфатаз [20], що їх залучено до негативної регуляції активності як ІР, так й інших сигнальних протеїнів інсулінового каскаду [21].

На різних модельних системах стану ІНР показано, що зниження афінності рецептора до його природного ліганду може бути причиною зменшення ензиматичної активності [22]. Однак у літературі відсутні дані щодо функціонування ІР за умов СТЦ-індукованої моделі ЦД 2-го типу. Тому для встановлення можливих причин зниження ТПК-азної активності в умовах даної експериментальної моделі потрібно було виділити рецептор із плазматичних мембран клітин і дослідити його ТПК-азну активність за умов різної концентрації інсуліну в середовищі інкубації.

Для очищення рецептора застосовували метод афінної хроматографії. Вибираючи афінний сорбент, керувалися здатністю ІР зв'язуватися з інсуліном. Для одержання афінного сорбенту було використано метод іммобілізації лігандів на матриці за допомогою бромціану. У літературі описано різні похідні BrCN-сефарози, які можуть бути використані для виділення й очищення ІР [12, 23]. Проаналізувавши недоліки та переваги кожного окремого носія, ми зупинили свій вибір на N-гідроксисукцинімід естері 3,3'-діамінодипропіламіносукциніл агарози, оскільки деякими авторами було підтверджено, що використання саме цього сорбенту дає змогу зберегти не лише структуру ІР, а й його інсулінзв'язувальну здатність та ТПК-азну активність [13].

Хроматограму виділення ІР із плазматичних мембран клітин печінки контрольних щурів на колонці з інсулін-сефарозою наведено на рис. 1. Як вихідний матеріал на колонку, попередньо врівноважену 50 мМ трис-НСІ-буфером, рН 7,4, наносили солюбілізовану мембранну фракцію клітин печінки щурів у тому самому буфері зі швидкістю 1 мл/хв. Після відмивання неспецифічно зв'язаних протеїнів проводили елюцію 50 мМ ацетатним буфером, рН 5,0, з 1 М NaCl та 0,1% -м Тритон X-100. Швидкість елюції становила 1 мл/хв.

У пробах, які містили протеїн, визначали ТПК-азну активність у присутності й за відсутності інсуліну (рис. 1). Метою досліджень

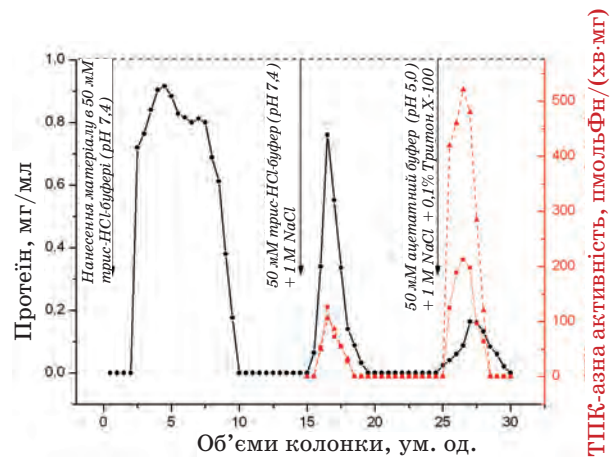


Рис. 1. Хроматограма виділення інсулінового рецептора із плазматичних мембран клітин печінки контрольних щурів на колонці з інсулін-сефарозою:

- концентрація протеїну в пробі;
- базальний рівень тирозинпротеїнкіназної активності ІР;
- ←—→ інсулінстимульована тирозинпротеїнкіназна активність ІР

було відокремлення специфічної активності ІР, оскільки плазматичні мембрани містять у своєму складі різні ензими з ТПК-азною активністю. Встановлено зростання ТПК-азної активності протеїнового матеріалу елюату в 3 рази у присутності інсуліну порівняно з базальним рівнем активності. Неспецифічно зв'язані протеїни також мали ТПК-азну активність, яка за присутності інсуліну залишалася на базальному рівні, що може свідчити про відсутність ІР у складі неспецифічно зв'язаного матеріалу (рис. 1).

Під час виділення рецептора з плазматичних мембран клітин печінки діабетичних тварин повністю дотримувалися вищезазначених умов хроматографії, що позначилось на тотожних результатах хроматографічного розділення (рис. 2).

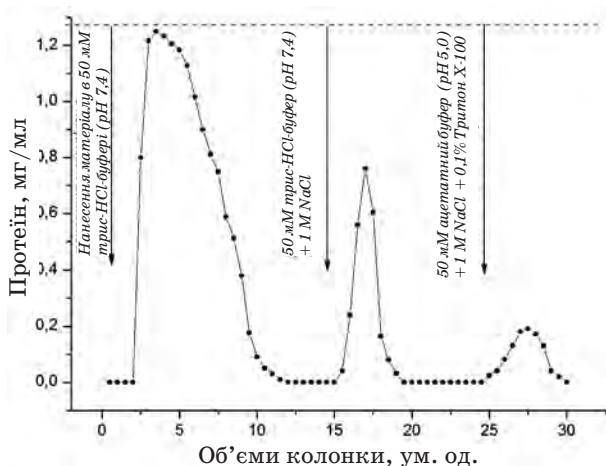


Рис. 2. Хроматограма виділення інсулінового рецептора із плазматичних мембран клітин печінки діабетичних щурів на колонці з інсулін-сефарозою

Результати електрофоретичного дослідження фракцій елюатів хроматографічного розділення протеїнів мембранної фракції клітин печінки контрольних та діабетичних щурів на колонці з інсулін-сефарозою були ідентичними (рис. 3, 1 і 2 відповідно).

За даними методу диск-електрофорезу в 6%-му ПААГ встановлено, що фракції елюатів за невідновлених умов містили протеїни з молекулярною масою 350 та 65 кДа (рис. 3, 1, А; 2, А). Згідно з [13, 24] α -субодиниця ІР має молекулярну масу 125–135, а β -субодиниця — 90–95 кДа. Деякі дослідники також фіксували на електрофореграмі очищеного ІР наявність смуги в ділянці 40–45 кДа [25]. Дослідження показали, що цей протеїн (пізніше названий β_1 -субодиниця) є фрагментом β -субодиниці ІР, який утворюється внаслідок протеолітичного розщеплення

останньої. Також було з'ясовано, що залежно від поєднання цих трьох субодиниць гетеротетрамерний комплекс ІР, виділений за допомогою афінної хроматографії, може мати молекулярну масу 350, 320 та 290 кДа, що відповідає комплексам $(\alpha)_2(\beta)_2$, $(\alpha)_2\beta\beta_1$ і $(\alpha)_2(\beta_1)_2$ відповідно [24].

Отже, виявлений на електрофореграмах протеїн з молекулярною масою близько 350 кДа відповідає $(\alpha)_2(\beta)_2$ гетеротетрамерному комплексу ІР (рис. 3, 1, А та 2, А). На обох електрофореграмах є додаткова смуга в ділянці 65 кДа (рис. 3, 1, А та 2, А), яку фіксували й інші дослідники [13, 26]. Встановлено, що кількість його зростала пропорційно до зменшення кількості β -субодиниці, а отже цей протеїн є продуктом протеолітичного розщеплення β -субодиниці 90 кДа [13, 26].

У разі додавання до зразків елюатів як відновлювального агента β -меркаптоетанолу на електрофореграмах зникає смуга в ділянці 350 кДа, характерна для гетеротетрамерного комплексу ІР, тимчасом як смуга в ділянці 65 кДа залишається (рис. 3, 1, Б та 2, Б). З'являється також новий протеїн з молекулярною масою 145 кДа (рис. 3, 1, Б та 2, Б), який, згідно з [13, 24–26], відповідає α -субодиниці ІР.

Для контролю якісного складу протеїнового матеріалу елюатів хроматографічного розділення протеїнів мембранної фракції клітин печінки контрольних та діабетичних щурів було проведено вестерн-блот-аналіз із використанням специфічних анти-ІР-антитіл (рис. 4, 1 і 2 відповідно). На обох блот-грамах виявлено смуги в ділянках 350 та 65 кДа, що відповідає молекулярним масам $(\alpha)_2(\beta)_2$ -комплексу ІР і фрагмента його β -субодиниці. Такі дані узгоджуються з описаними раніше результатами методу електрофорезу в 6%-му ПААГ, проведеного за невідновлених умов (рис. 3, 1, А і 2, А).

Результати диск-електрофорезу та вестерн-блот-аналізу свідчать, що за афінної хроматографії мембранної фракції клітин печінки щурів протеїновий препарат відповідає гетеротетрамерному комплексу ІР, його окремим субодиницям і фрагментам. Проведені дослідження дають підстави стверджувати, що виділений таким чином ензим зберігає свої фізіологічні властивості (ТПК-азну активність, активуватися інсуліном), а отже може бути використаний в експериментах.

У подальшій роботі нами було визначено ТПК-азну активність чистого ензиму в присутності у середовищі інкубації відповідного гормону в діапазоні концентрацій від 10^{-11} М до 10^{-5} М.

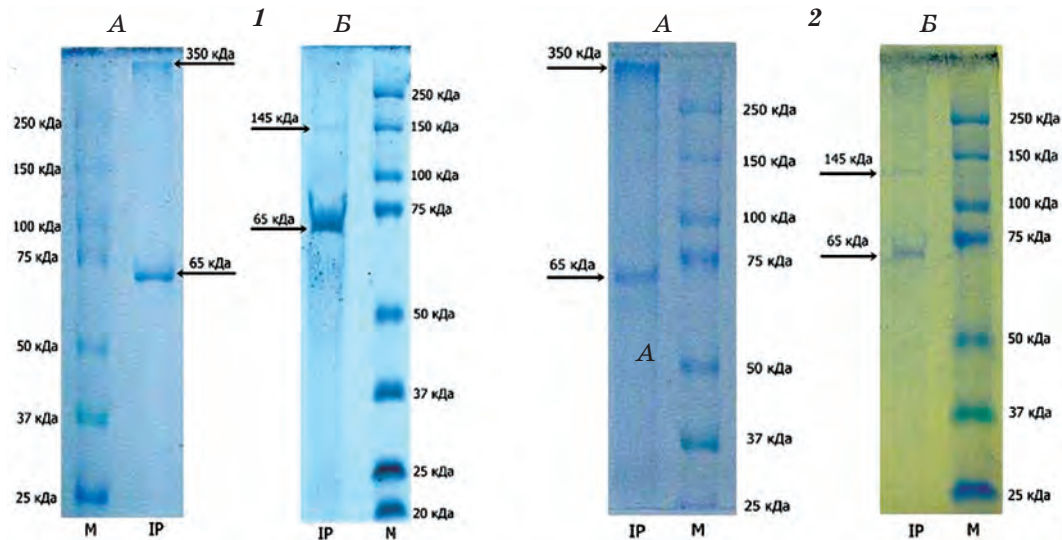


Рис. 3. Електрофореграми інсулінового рецептора з клітин печінки контрольних (1) та діабетичних (2) щурів за невідновлених (А) та відновлених (Б) умов: ІР — протеїнова фракція елюату; М — маркери з молекулярною масою 250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20 кДа

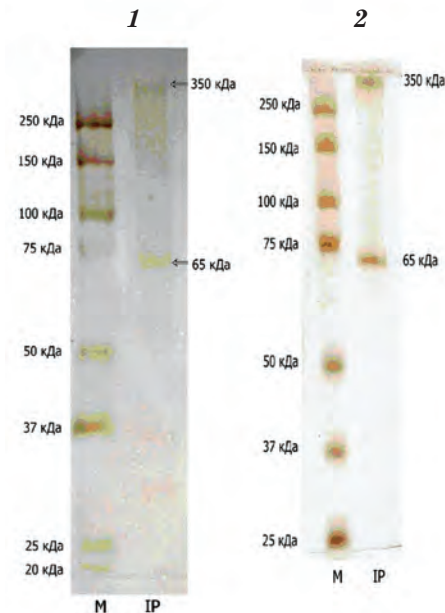


Рис. 4. Блотограма інсулінового рецептора із клітин печінки контрольних (1) та діабетичних (2) щурів на основі електрофорезу в 6%-му ПААГ, проведеного за невідновлених умов: ІР — протеїнова фракція елюату; М — маркери з молекулярною масою 250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20 кДа

Результати дії інсуліну на активність ІР контрольних тварин показали, що за концентрації гормону 10^{-8} М (10 нМ) спостерігалось максимальне зростання ТПК-азної активності ІР порівняно з відповідними показниками без дії активатора (рис. 5). За концентрації гормону вище 10^{-7} М (100 нМ) спостерігали інгібуючий ефект інсуліну на ТПК-азну активність ІР (рис. 5). Це узгоджується з даними інших

робіт, де вивчали функціонування рецептора та його кінетику зв'язування з інсуліном [27].

Нами було показано, що ІР, виділений з клітин печінки щурів із СТЦ-індукованою моделлю ЦД 2-го типу, виявляв свою максимальну активність за концентрації гормону 10^{-8} М, що характерно і для рецептора контрольних тварин. Також за ЦД 2-го типу ТПК-азна активність очищеного препарату за відсутності дії інсуліну знаходилася в межах контрольних значень ($514,7 \pm 28,1$ та $515,4 \pm 51,5$, відповідно), що узгоджується з [28]. Результати можуть бути додатковим доказом, що стан ІР, а саме його здатність активуватись у відповідь на дію ліганду за умов нашого експерименту залишалися незмінними, а отже не могли бути причиною розвитку стану ІНР за обраної моделі ЦД.

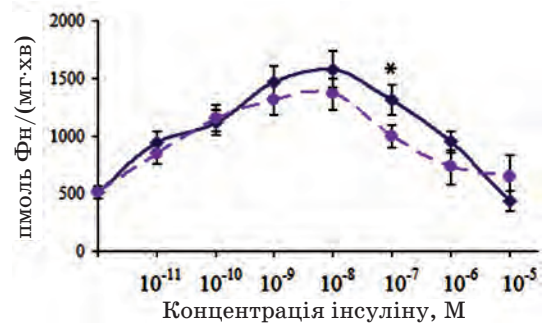


Рис. 5. Залежність тирозинпротеїнкіназної активності інсулінового рецептора, виділеного з плазматичних мембран клітин печінки контрольних щурів (—) і тварин з експериментальним ЦД 2-го типу (- - -), від концентрації інсуліну в середовищі інкубації * $P < 0,05$ порівняно з показниками контрольної групи тварин

Таким чином, було виділено й охарактеризовано протеїновий препарат ІР із плазматичних мембран печінки контрольних та діабетичних тварин, якість та чистоту якого підтверджено методами електрофорезу та вестерн-блоту. Порівняльний аналіз залежності ТПК-азної активності ІР, очищеного з плазматичних мембран клітин печінки контрольних та діабетичних тварин, від концентрації інсуліну показав, що за умов

експериментального ЦД 2-го типу здатність рецептора активуватись у відповідь на дію ліганду не змінювалась. На підставі цих даних можна зробити висновок, що зниження тирозинкіназної активності рецептора не є універсальним механізмом розвитку ІНР. Це також було продемонстровано низкою інших досліджень, проведених на очищених за допомогою афінної хроматографії ІР від пацієнтів з інсуліннезалежною формою ЦД [29, 30].

REFERENCES

1. Siddle K. Signalling by insulin and IGF receptors: supporting acts and new players. *J. Mol. Endocrinol.* 2011, 47 (1), 1–10.
2. Jensen M., De Meyts P. Molecular mechanisms of differential intracellular signaling from the insulin receptor. *Vitam. Horm.* 2009, V. 80, P. 51–75.
3. Tengholm A., Idevall-Hagren O. Spatio-temporal dynamics of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate signalling. *Vitam. Horm.* 2009, V. 80, P. 288–311.
4. Sasaoka T., Kobayashi M. The functional significance of Shc in insulin signaling as a substrate of the insulin receptor. *Endocr. J.* 2000, 47 (4), 373–381.
5. Siddle K. Molecular basis of signaling specificity of insulin and IGF receptors: neglected corners and recent advances. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 2012, 3 (34), 1–24.
6. Saini V. Molecular mechanisms of insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. *World J. Diabetes.* 2010, 1 (3), 68–75.
7. Lin Y., Sun Z. Current views on type 2 diabetes. *J. Endocrin.* 2010, 204 (1), 1–11.
8. Olefsky J. M., Kolterman O. G. Mechanisms of insulin resistance in obesity and noninsulin-dependent (type II) diabetes. *Am. J. Med.* 1981, 70 (1), 151–168.
9. Trischitta V., Brunetti A., Chiavetta A., Benzi L., Papa V., Vigneri R. Defects in insulin-receptor internalization and processing in monocytes of obese subjects and obese NIDDM patients. *Diabetes.* 1989, V. 38, P. 1579–1584.
10. Kim D., Cho S. Y., Yeau S. H., Park S. W., Sohn Y. B., Kwon M. J., Kim J. Y., Ki C. S., Jin D. K. Two novel insulin receptor gene mutations in a patient with Rabson-Mendenhall syndrome: the first Korean case confirmed by biochemical, and molecular evidence. *J. Korean. Med. Sci.* 2012, 27 (5), 565–568.
11. Galenova T. I., Konopelnyuk V. V., Savchuk O. M., Ostapchenko L. I. Reproduction of the streptozotocin-induced experimental model of type 2 diabetes mellitus in rats. *Physyca zhyvogo.* 2010, 18 (3), 50–54. (In Ukrainian).
12. Cuatrecasas P. Affinity chromatography and purification of the insulin receptor of liver cell membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1972, 69 (5), 1277–1281.
13. Fujita-Yamaguchi Y., Choi S., Sakamoto Y., Itakura K. Purification of insulin receptor with full binding activity. *J. Biol. Chem.* 1983, 258 (8), 5045–5049.
14. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976, V. 72, P. 248–254.
15. Crowther J. R. The ELISA Guidebook: Second Edition. Totowa N. J.: Humana Press, 2010, 566 p.
16. Weber K., Osborn M. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 1969, 244 (16), 4406–4412.
17. Harlow E., Lane D. Antibodies. N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988, 726 p.
18. Freidenberg G. R., Reichart D., Olefsky J. M., Henry R. R. Reversibility of defective adipocyte insulin receptor kinase activity in non-insulin-dependent diabetes mellitus. Effect of weight loss. *J. Clin. Invest.* 1988, 82 (4), 1398–1406.
19. Caro J. F., Sinha M. K., Raju S. M., Ittoop O., Pories W. J., Flickinger E. G., Meelheim D., Dohm G. L. Insulin receptor kinase in human skeletal muscle from obese subjects with and without noninsulin dependent diabetes. *J. Clin. Invest.* 1987, 79 (5), 1330–1337.
20. Halenova T. I., Bohdanova O. V., Savchuk O. M., Ostapchenko L. I. Protein tyrosine kinases and phosphatases activity in liver, muscle and adipose cells of rats under type 2 diabetes mellitus. *Medychna Khimiya.* 2010, 12 (4), 26–31. (In Ukrainian).
21. Stull A. J., Wang Z. Q., Zhang X. H., Yu Y., Johnson W. D., Cefalu W. T. Skeletal muscle protein tyrosine phosphatase 1B regulates insulin sensitivity in African Americans. *Diabetes.* 2012, 61 (6), 1415–1422.
22. Freidenberg G. R., Henry R. R., Klein H. H., Reichart D. R., Olefsky J. M. Decreased kinase activity of insulin receptors from adipocytes of non-insulin-dependent diabetic studies. *J. Clin. Invest.* 1987, V. 79, P. 240–250.
23. Krug F., Desbuquois B., Cuatrecasas P. Glucagon affinity absorbents: selective binding of receptors of liver cell membranes. *Nat. New Biol.* 1971, 234 (52), 268–270.

24. Massague J., Pilch P. F., Czech M. P. Electrophoretic resolution of three major insulin receptor structures with unique subunit stoichiometries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1980, 77 (12), 7137–7141.
25. Jacobs S., Hazum E., Shechter Y., Cuatrecasas P. Insulin receptor: covalent labeling and identification of subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1979, 76 (10), 4918–4921.
26. Kasuga M., Fujita-Yamaguchi Y., Blithe D. L., Kahn C. R. Tyrosine-specific protein kinase activity is associated with the purified insulin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1983, 80 (8), 2137–2141.
27. White M. F., Haring H. U., Kasuga M., Kahn C. R. Kinetic properties and sites of autophosphorylation of the partially purified insulin receptor from hepatoma cells. *J. Biol. Chem.* 1984, 259 (1), 255–264.
28. Adamo M., Shemer J., Aridor M., Dixon J., Carswell N., Bhathena S. J., Michaelis O. E., LeRoith D. Liver insulin receptor tyrosine kinase activity in a rat model of type II diabetes mellitus and obesity. *J. Nutr.* 1989, 119 (3), 484–489.
29. Klein H. H., Vestergaard H., Kotzke G., Pedersen O. Elevation of serum insulin concentration during euglycemic hyperinsulinemic clamp studies leads to similar activation of insulin receptor kinase in skeletal muscle of subjects with and without NIDDM. *Diabetes*. 1995, V. 344, P. 1310–1317.
30. Obermaier-Kusser B., White M. F., Pongratz D. E., Su Z., Ermel B., Muhlbacher C., Haring H. U. A defective intramolecular autoactivation cascade may cause the reduced kinase activity of the skeletal muscle insulin receptor from patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Biol. Chem.* 1989, V. 264, P. 9497–9503.

**ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА
ИНСУЛИНОВОГО РЕЦЕПТОРА
ПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАН КЛЕТОК
ПЕЧЕНИ КРЫС НА МОДЕЛИ ДИАБЕТА
2-го ТИПА**

*Т. И. Галенова, М. Ю. Кузнецова,
О. М. Савчук, Л. И. Остапченко*

Киевский национальный университет
имени Тараса Шевченко, Украина

E-mail: galenovatanya@rambler.ru

Выделен инсулиновый рецептор из мембран клеток печени контрольных и диабетических крыс. Чистота и качество полученного протеинового препарата были подтверждены результатами методов электрофореза и вестерн-блот-анализа. Исследована тирозинпротеинкиназная активность выделенного препарата в присутствии в среде инкубации инсулина, в диапазоне концентраций от 10^{-11} М до 10^{-5} М. Установлено, что в условиях экспериментального сахарного диабета 2-го типа тирозинкиназная активность очищенного рецептора, при отсутствии инсулина, находилась в пределах соответствующих контрольных значений. Показано, что как в контроле, так и при сахарном диабете инсулиновый рецептор проявлял максимальную активность при концентрации гормона 10^{-8} М. Полученные результаты свидетельствуют о том, что в условиях эксперимента не наблюдали нарушений в функционировании инсулинового рецептора, которые могли бы быть причиной развития инсулинорезистентного состояния.

Ключевые слова: инсулиновый рецептор, инсулинорезистентность, сахарный диабет 2-го типа.

**ISOLATION AND CHARACTERIZATION
OF INSULIN RECEPTOR OF PLASMA
MEMBRANES OF RAT LIVER CELLS
AT TYPE 2 DIABETES MODEL**

*T. I. Halenova, M. Y. Kuznetsova,
O. M. Savchuk, L. I. Ostapchenko*

Taras Shevchenko National University of Kyiv,
Ukraine

E-mail: galenovatanya@rambler.ru

The insulin receptor was isolated from the liver cell membranes of control and diabetic rats. The protein purity was controlled by electrophoresis and Western blot. The tyrosine kinase activity of the insulin receptor was investigated in the incubation medium in the presence of insulin (concentration range: from 10^{-11} M to 10^{-5} M). The basal tyrosine kinase activity of the insulin receptor (in the absence of insulin) was equal for the control and diabetic state. Maximal tyrosine kinase activity of the diabetic and control insulin receptor was observed at the insulin concentration of 10^{-8} M. Results indicate that type 2 diabetes did not cause the irregularities in the functioning of the insulin receptor that could be the reason of insulin resistance.

Key words: insulin receptor, insulin resistance, type 2 diabetes mellitus.